

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 周 勝敏

生命活動による無機窒素の循環は窒素サイクルと呼ばれ、その主要な過程は窒素固定、硝化、および脱窒である。この3過程以外にも、もっとも酸化された窒素形態である硝酸については多様な代謝系が存在する。植物や微生物には、窒素源として硝酸態窒素を利用するため、硝酸を亜硝酸を経てアンモニアに還元し、アミノ酸などの有機物に取込む経路が存在する。この過程は同化型硝酸還元と呼ばれる。一方硝酸は原核生物やカビにおいて、呼吸や発酵のための電子受容体として利用される。このような生命反応を異化型硝酸還元と呼び、そのうち最終産物が N_2 や N_2O などのガス状窒素である場合、脱窒と呼ぶ。また、必ずしもエネルギー (ATP) 産生に結びついていない窒素還元や、本論文の主課題であるフラボヘモグロビン (Fhb) による酸化反応なども含め、明らかに同化が目的でない無機窒素代謝をまとめて窒素異化代謝と呼ぶ。この定義によれば同化目的の窒素固定は窒素異化代謝には含まれず、エネルギー産生が目的の硝化は含まれることになる。しかし慣例上、硝化は窒素異化代謝とは呼ばれない。

従来、窒素サイクルには原核生物のみが関わりと考えられてきた。しかるに近年 *Fusarium oxysporum* その他のカビが脱窒することが発見され、カビ脱窒系に関して当研究室を中心に、生化学的、分子生物学的解明が進められてきた。その結果、カビ脱窒系はミトコンドリアに局在し、細菌脱窒系と同様に嫌気呼吸として働いていることが明らかとなっている。一方多くのカビゲノムが解読されてきているが、我々はわが国でゲノムの解読された麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムに *nirK*、*CYP55* (P450_{nor}) などの脱窒関連遺伝子ホモログの存在を見出した。当研究室の中西はこの *nirK* ホモログ産物が細菌のオルソログと同様に銅含有型亜硝酸還元酵素 (NirK) をコードすることを明らかにした。*A. oryzae* には *F. oxysporum* などで脱窒に関わることが示唆されている Fhb や、細菌のペリプラズム局在型硝酸還元酵素 (Nap) などのホモログ遺伝子も見出される。本論文ではこれら *A. oryzae* に見出された Fhb、Nap、NirK などのホモログ遺伝子産物の性質、生理機能などの解明を目的とした。細菌の Fhb は一酸化窒素 (NO) ジオキシングナーゼ (NOD) 活性を示し、NO ストレスに応答することが知られている。

A. oryzae には Fhb 遺伝子ホモログが二つ見出され、それぞれ *fhb1* (遺伝子産物は Fhb1)、*fhb2* (同 Fhb2) と命名した。Fhb2 にはその N-末にミトコンドリア移送シグナルの存在が予想された。これら遺伝子をクローニング、大腸菌で発現し、組換え体タンパク質の性質を明らかにした。両者とも Fhb に特徴的な吸収スペクトルを示し、NOD 活性を持っていた。また両者のコファクターとして FAD を同定し、それぞれの含有量を定量した。電子供与体として Fhb1 は NADH と NADPH の両者を利用できるが、Fhb2 は NADPH に特異的であっ

た。この結果は FHb1 および FHb2 がそれぞれサイトゾルとミトコンドリアに局在することを示唆する。

fhb1、*fhb2* の NO ストレスへの応答を real-time PCR により観察した。その結果、*fhb1* は NO ストレスにより 15 倍の up-regulation が観察されたが、*fhb2* の発現はさまざまな条件でも観察されなかった。両者の遺伝子破壊株 ($\Delta fhb1$ 、 $\Delta fhb2$) を作成し、その表現系の観察から両遺伝子の生理機能の解明を試みた。その結果 *fhb1* は細胞の形態に関わることが示され、さらに NO ストレスへ応答することも明らかになったが、*fhb2* に関してはそのような結果は得られなかった。一方 *fhb2* はゲノム上で *nirK* に隣接することから、その脱窒への関連が示唆された。そこで *nirK* 高発現株を用い、脱窒条件の時に *fhb2* が初めて発現することを示した。この結果により、ミトコンドリアに NO が多く発生する時のみ *fhb2* が発現することが示され、*fhb2* も NO ストレスに対応することが明らかとなった。

$\Delta fhb1$ 、 $\Delta fhb2$ はまた、酸化ストレス (H_2O_2) 感受性が鈍くなっていることが発見されたが、その機構の解明を試み、FHb がフェントン反応による水酸ラジカルの生成を促進する機構が提案された。

以上、本論文はカビの FHb について詳細に解析した最初であり、また複数の FHb アイソザイム遺伝子を同一生物からクローニングし、生理的意義を解析した初めての例である。ここでは 2 種のアイソザイム FHb1 および FHb2 について、その細胞内局在、生理的意義の違いなどを明らかにした。とくに FHb2 がミトコンドリアの脱窒に関与 (NO の解毒) することが強く支持されたことは大変興味深い。

FHb 以外の硝酸異化代謝関連遺伝子として、*napA* ホモログおよび *nirK* にも注目した。*napA* は細菌脱窒系に関与する硝酸還元酵素遺伝子であるが、それがカビに存在することを示せば重要な発見となる。この遺伝子をクローニング、発現し、活性を確認しているが、精製には至っていない。また *nirK* 破壊株を作成し、脱窒との関連を調べた。得られた結果は期待通りではなかったが、妥当な結論は得ている。

以上本論文は、カビで初めて FHb 遺伝子を麹菌から 2 種単離し、それらの NO ストレスへの応答や脱窒への関与を明らかにした。さらにカビで初めてとなる *napA* ホモログの異種宿主発現にも成功し、その生理機能解明の基礎を固めた。これら成果は学術上ならびに応用上貢献するところ大である。よって審査員一同は本論文が博士 (農学) の学術論文として価値あるものと認めた。